

JP62244382A

MicroPatent Report**TRYPTOPHAN OPERON, PEPTIDE AND PROTEIN CODED THEREBY, UTILIZATION OF TRYPTOPHAN OPERON GENE EXPRESSION AND PRODUCTION OF TRYPTOPHAN****[71] Applicant:** AJINOMOTO CO INC**[72] Inventors:** MATSUI KAZUHIKO;
SANO TAKANOSUKE;
MIWA KIYOSHI;
OTSUBO EIICHI**[21] Application No.:** JP61087600**[22] Filed:** 19860416**[43] Published:** 19871024[Go to Fulltext](#)**[57] Abstract:**

PURPOSE: To efficiently produce the titled tryptophan in a large amount, by cultivating a microorganism transformed by a DNA sequence capable of coding an enzymic group of a tryptophan synthetic system, etc., in a culture medium.

CONSTITUTION: A chromosomal gene obtained by extracting microbial cells of *Brevibacterium lactofermentum*, etc., of the genus *Brevibacterium* is cleaved with a restriction enzyme to give a DNA, consisting of DNA expressed by the formula containing an operator region controlling the synthesis of m-RNA, promoter region controlling the synthesis of m-RNA, etc. The resultant DNA is then subjected to ligation reaction with a plasmid vector to afford a recombinant DNA, which is further introduced into a variant strain requiring tryptophan to carry out transformation and provide coryneform bacteria having the ability to produce tryptophan. The resultant bacteria are then aerobically cultivated in a culture medium containing a carbon source, nitrogen source, etc., to produce and accumulate the aimed tryptophan in the culture medium.

COPYRIGHT: (C)1987,JPO&Japio

[51] Int'l Class: C12N01500 C07H02104 C07K01300 C12P01322
C12P02102 C12P01322 C12R00113 C12P01322 C12R00115

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報 (A)

昭62-244382

⑫ Int. Cl. 1

C 12 N 15/00
C 07 H 21/04
C 07 K 13/00
C 12 P 13/22

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和62年(1987)10月24日

7115-4B
7138-4C
8318-4H

A-7236-4B※審査請求 未請求 発明の数 8 (全20頁)

⑭ 発明の名称 トリプトファンオペロン、トリプトファンオペロンにコードされるペプチド及び蛋白、トリプトファンオペロンの遺伝子発現利用方法及びトリプトファンの製造法

⑮ 特願 昭61-87600

⑯ 出願 昭61(1986)4月16日

特許法第30条第1項適用 昭和60年11月15日 日本分子生物学会発行の「第8回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集」により発表

⑰ 発明者 松井 和彦 川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内
⑱ 発明者 佐野 孝之輔 川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内
⑲ 発明者 三輪 清志 川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内
⑳ 発明者 大坪 栄一 東京都文京区西片1-13-6
㉑ 出願人 味の素株式会社 東京都中央区京橋1丁目5番8号

最終頁に続く

明細書

1. 発明の名称

トリプトファンオペロン、トリプトファンオペロンにコードされるペプチド及び蛋白、トリプトファンオペロンの遺伝子発現利用方法及びトリプトファンの製造法

2. 特許請求の範囲

1) m-RNA の合成をコントロールするオペレーター領域、m-RNA の合成をコントロールするプロモーター領域、m-RNA の合成をコントロールするアティニュエーター領域、蛋白合成に必要なリボソームと mRNA との結合領域、リーグーペプチドをコードする領域、トリプトファン合成系の酵素群をコードする領域及び最後に mRNA の合成を停止させるシグナルを形成するターミネーター領域が含まれる下記第一式に示される配列よりなるDNA

CCCGGTTCTG GCCATTCTG TCCCTGAGGT GCGTAATGCC CAAGAATTGT GCGATATGCC GCACCGTGTG CCGTGGCCGCT TGTGGGTGCT GTCGGGAGTT
 GGGCAACAC CGCTAACAC AGGGACTCCA CGCATTAGG GTCTTAAACA CCCTATACCG CGTGGCACAG CGACCCGGCA ACACCCACGA CAGCCCTCA
 TCCCTTGTAA TTGCTCCGCT ACTTCCGTTT GTGGCCTCT GTGGGATGT GCGTGGTGTG GCGATTGGT GTGTCGCTG CCATGGTGT CATTGGCATG
 AGGAAACAT AACGGACCGA TCAACCCAAA CACCGAAGA CCACCTACA CGGACCCAGCA CGCTAACCCA CAACAGCGAC CGTAGCACAA GTCACCGTAC
 GGTGGGGTA TGGCTCCCCA TACTGTTGCG ATGCTGATG CGAACCGAGT CGCGAACCC CGCAGGGGCC TGTGTCGCT GAAATTGAG AGGAGGGCCG
 CCACGGCCAT ACCGACCCGT ATGACACCC TACCAACTAC GCTGGCTCA GCGCTTGGG GCGTCCCCGG ACAAAGGGCA CTTAACTTC TCCCTGGGG
 TGGTGTGACT ATTACCTCG CGATTATCAA CAAGACTCG CGAATGCC CCAAGATTCA CTGCGATGCA GTGCGTAGAG CTGCGGAAAC TACACAAGAA
 ACCACACTGA TAATGGAGG GCTAATAGTT GTTCTGAGG GACTTACGGG GGTGCTAATC GAACTACGTC CACCGATCTC GACGGCTTTC ATGTTCTT
 CCGAAATG ATTAATAATT GAGACAGCT TCCCACATG TGATAAGTC CCATTTGTG AATAACTCTT CTCTCACTCA AAGCACCCAG TGGTGGTGC
 GGGTTTAC TAATTTAA CTCTCTGCA AGGGTGTAC ACTATTCAG GGTAAAACAC TTATTGAGAA CAGACTCACT TICGTCGGTC ACCACCCAG
 CGCCCTAAGTA AGCGACCCGTG ACACCTCAAG TTGTTTCAC TTGATGAT TTTTAAGGC TCGTACTTCG TTGCGAGGAG AAGGGGGCTT TTTGTTGCTT
 CGCGATTGAT TCGCTCGAC TGTGGACTTC AACAAAGTC AACTACTTA AAAATTCCG AGCATGAGC AAGCTCCCTC TTGCGCCCCA AAACACCAA
 TTAGCCCCACA ACCGGCAAGC CCTGGATGCA ATGAGCTCG CAGGGAGTAA TTATTTGATG TTGCGGAGC AGGCTTCAGC CCCACAAATGA TTTGCTGGT
 AATGGGTGTG TGGCCCTTCG GGACCTAGCT TACTTCGACC GTGCGCTATT AATAAAACTAC AAAGGGTCTT TCGGAAGTGC GGGTGTACT AAAGGAGCA
 AGGTGGCCCA TGAGCACGAA TCCCCATGTT TTCTCCCTAG ATGTCGGCTA TCACGGAGGAT GCTTCTGGT TGTGTCGCCC CTTGGTGGC ACAACGGAG
 TCCACGGGGT ACTCGTGTCT AGGGCTACAA AACAGGGATC TACAGGGCAT AGTGGCTCTA CGAACACCGA ACAAACGGGT GAAACCCACCC TGTGGCGC
 ATGATGCAGC CCTGTTGGAA AGCGCTGATA TCACCAACAA GAATGGTATT TCTTCCCTCG CGGTGTTGAA GAGTTCGGTG CGCATTACGT GCACGGGCAA
 TACTACCTCG GGACAAACCTT TCGCGACTAT AGTGGTGGTT CTIACCTAA AGAAGGGAGC GCCACAACTT CTCAAGCCAC CGCTAATGCA CGRFCCCGTT

CACGGTGGTA AGCGACCCGG TGACGGACTC GGGTACGGCA CTGGTTGGCC CCCTAACACA CGTACAACA CGGAGAGAGA CACCTTAC
 GTGCCACCAT TCCGCTGGG ACTGCGTGA CCCATCCCGT CACCAACCGG CGGATTGTG CTGCGAACCG GTCATGTTG GCGTCTCTT GTGGAATGCC
 TTCCCCCGCT CGGATGGGGT TGATGAGGCC GAGCCCTCA CGGCCACCAAG CACCATCGA GTGCGTGGCA ACTGGCAGTT CGACTCCGGC TACAGCGAC
 AAGGGGGGGA CGCTACCCCA ACTACTCCCG CTGGGGAGT GCGCTGGTCT GTGGTACGTT CACGACGGCT TCAACCTCAA GCTCAGGGCC ATGTCGGCTC
 CGTCCCTGGC ACTGCTCATG GCGGGTTTCG CCTTGTATT CTTAGAAACC TTGAAACCC TCCCGGAGT CGAGGAAAGC GTCAACACTT ACGCCGATTA
 CGAGGGACGG TGACGGAGTAC CGCCCAAAGC GGAAACTAAA GAATCTTGAG AACTTTGGG AGGGGGCTCA GCTCCTTTCG CAGTGTGAA TGGGCTTA
 CCAGTTCTGC CTCGGGAAA TCGTCCCTGCA CATCAATCAC CAGGACAGA CGGCCAAACT CACCCGGTC TCCACGGCC CAGGGAGCT CGAGGGGGAG
 GGTCAACCGAG GAGCCCTT ACCAGGACCT GTAGTACTG GTCTGGCTC GCGGTTTGA GTGGCGGAG AGGTTGGGG GTCCTCTCGA CCTCCGGCTC
 CTCAACAAAGC TTTCATTGCT TATGAGGCC GCGCTCCCG CAACCAACA CGCCTACCA ACCACCCCTC ACCAGGGGGA CACTCTTCCG TTGTTGGCTC
 GAGTTGTTG AAGTAAAGCA ATACCTCCCG CGGGAGGGGG GTTGGCTGT CGGATGGTT TGGTGGGGAG TGCTCCGGCT GTGAGANGCC CAACACCGAG
 ATATTCCCGA TGCTCAGTTC CGCACTCAGA TCAATGAGCT GAAAGAAAC ATTACAACG GTGACATCTA CCAACTTGTG CCGGGGGCCA CTTTCACCC
 ATATTGGCT ACGACTCAAG CGCTGAGTCT AGTACTCTGA CTTTCTTTC TAAATGTGCA CACTGTAGAT GTTCAACAG GGGGGGGCT GAAAGTGGCG
 ACCATGCTCT GATGCATCCT CGCTTATCT CGACCTGGGT CGCACCAACC CGTGGGGTA CATGTCTAT ATCCGTGGAC TCAACGAAGC TCGCTCC
 TGGTACAGGA CTACCTAACG GACCAATAGA CGTCCACCC CGGTGGTGG CGACGGCAT GTACAAGATA TAGGCACCTG AGTGGCTTCC AGCGAGGATA
 GAACTTTTC CGGCATCCCC TGAGTCCAACT CTCAAGTTCA CGCGCTGCTAA CGGTGGCTG CAGCTGTACG CAATGGCAGG TACCCGGCC CGTGGACTCA
 CTTGAAAAC CGCGTAGGGG ACTCAGGTTG GACTTCAGT CGCGACCGATT CGCACTCGAC GTGCGACATGG GTTACCGTCC ATGGGCGGGG CGACCTGAGT
 ACCCAGATGG CTCCATCAAC GATGAGCTAG ATATCCCAA TGAGTTGGAT ATGCCAACAG GATGGGGAC GACACCATGC TTGTCGATCT
 TGGCTCTACC GAGGTAGTTG CTACTCGATC TATAGGGTT ACTCAACCTA TACGGCTGAC TACGGTTCT CTAGGGCTG CTGCGTACG AACAGCTAGA
 CGGGGGCAAC GACCTGGGG CGCTCTCCGCT CGCAGGGCTG CGGGGGGGTG CGGATTTTG CGAGGTGGAT CGCTATTCCC CGGTGATGCA TTGCGTCTC
 CGGGGGCTTG CTGGAGGGGG CGCAGAGCCA GGGTCGCAGC CGGGGGCAAC GCCTAGAAA CGTCCACCTA CGCATAAGGG CGCACTACCT GAAACACAGG

CGTGTGACGG CCCAGAGCTT GATGCTTGG AGCCCTATCG GGCGTGCATG AATATGGCA CGTTGACCGG CGCTCCGAG TTGGCGGCTA
 GCACACTGCC GCTGCCACCT GGGTCTCGAA CTACCAAACC TCGGATAGC CGCACCTAC TTATACCCGT CAAACTGGCC GCGAGGCTC AACGGGGAT
 TGGAGCTGTT GGCGGGCGTC GAAAAGGGCA GGCGTGGTC TTATGGTGGG CGAGTGGGGT ACCTGGGGG CAATGGGGAT ATGGATAATT CGATTCTTAT
 ACCTGGACAA CGGGGGCGAG CTTTCCGCT CGGCACCAAG AATACCAACCC CGTACACCCCA TGGACCCGCC GTTACCGCTA TACCTATTAA CGTAACAAATA
 TCGTTGGCG TTTGTCCAGG ATGGTGTGGC TGCTGTGCAG GCTGGTCTG GTGTGGTCCG CGATTCTAAT CCTCAATCTG AAGGGATGA GACGGTGCAC
 AGCAAGGGC AAACAGGTCC TACACACCG ACCACACGTC CGACCAAGAC CACACCAGGC GCTAAGGTTA GGAGTTAGAC ITGGCTACT CTGCAACGTG
 AAGGGCTATG CGCTGTTGAA TGCCATGGC CTTGCTGCTG GTTCCACTT GGAGGTCACT CGATGACACA CGTTGTTCTC ATTGATAATC ACCATTCTT
 TTCCGCATAC CCCACAACCT ACCGTAACCC GAACGACGAC CAAGGTGAAA CCTCCAGTAG GCTACTGTGT GCAACAAAGAG TAATCTATTAG TGCTAAGAAA
 TCTCTACAAAC CTGGTGGATG CGTTGGCGT GGGGGCTTAT AAGTCCACGG TGTCGGCAA TACGGTGGCA GTTCAACCCA TTTGGCAGC CAACCCGGAC
 ACAGATGTG GACCACTAC GCAAGGGCA CGGGCCAATA TTCACTGGC ACAGGGCTT ATGCCACCGT CAACCTTGT AAAACCGCTG GTGGGGCTG
 CTGATCTGCC TTTCACCTGG ACCTGGTTAC CCTGGCGATG CGGGCAACAT GATGGCGCTG ATCGAGGGCA CACTGGCCA GATTCTTA CTGGTATT
 GACTAGACGG AAAGTGGACC TGGACCAATG CGACGGCTAC CGGGCTGTA CTACCCGAC TAGCTGGCT GTGAGGGCT GTAGGAAAT GACCCATAAA
 CGCTCGGCTA CGAGGCACCTC ATCGAATACC ACGGGGGCA GGTTGAGGCT TGTCGGCTG TGACGGGCAC CACCGACAAC ATGATCTTA CTGATGCCAG
 CGGACCCGAT GGTCGGTAG TAGCTTATGG TGGCGCCCTT CCAACTCGGA ACACGGGAC AGCTGGCTG GTGGCTGTT TACTAGGAAT GACTACGTCC
 TGTCAGAGC CCTGTTTTC CAGGTCTTGC CACTGATTT GAGCTGATGTC ATCCAGAACT CCCAGGGCCG AAGGTTCCAA TTGGCCGTTA TCACTACTG
 ACACGGCTCG GGACAAAAAC GTCCAGAACG GTGACTACAA CTGGACTAG TAGCTTCTCA GGGTCGGCG TTCAACGGT AAACGGCAAT AGTGAATGAC
 GGCTGGCTGG TTGGCCGAGA CGGTATTGAA TCATTGGCA CCTGTTCTC TGAGATTGGT GATGTCATCA TGCGGGCAGG CACCCACCGAT CGAAAGGCCA
 CGGACCCACC AACGGGGCTG GCCATAACTT AGTACCCGT GGACAGGAG ACTCTAACCA CTACAGTAGT ACCGGCGTGC GTGGTGGCTA CCTTCCGGT
 TTGGCCTGCA GTTACCCCT GAGTCAGTGC TGAGCCAAAC GGTCCTATC ATTTGTCCC GCTCTGTGCA ACAAATCTC CGGAACAAAT AAAAGGATT
 AACCCGACGT CAAAGTGGGA CTCACTCACG ACTCGGGTTG CCCAGGATAG TAAACAGGG CGACACAGCT TGTGAAGAG CGCTTGATTA TTTTCTAA

TGATTCTGAA CCTCTCCAGC AACACTGAAA GTTCTCAACG CCTACTTGGA TAACCCCACT CCAACCCCTGG AGGAGGCAAT TGAGGTGTT ACCECCCTGAA
 ACTAAGTACT GAAGAGGTCG TTGTGACTTT CAAGAGTTGC CGATGAACTT ATTGGGTGA CGTTCGGACCC TCCTCCGTTA ACTCCACAAG TGGGGCCACT
 CGCTGGCTGA ATACGATGAC GTGCACATCG CACCGCTGCT TCCGACCATC CGTACTCGCG GTGACCACTT CGCTGATATT GCGGGCGCTG CCAAGGCATT
 CGCAACCCACT TATGCTACTG CACCTGTAGC GTGCGGACCA ACCCTGGTAG GCATGAGCAG CACTCGTCAA CGCACTATAA CGGGGGGAC CGTTCCCTAA
 CCTCCGGGGCG CGTCGTCGCT TCCCGATTAC TCCGGCAGGT TTGCTAGATT CGCTGGCAC TGTCGGCAC CGTCCAAACAT CGATCAACAT CACCCACGGG
 CGAGGGGGCG CGAGCAGGCA AGGGCTAATG ACCGGCTCCA AACGATCTAA GGGCACCGTG ACCACGGCTG CGACGGTTGT GTAGTGTCA GTGGTGGGG
 CGTTCCCTGA TCCGACGATC CGGTGGAGTC AAGCTGGCTA ACCACGGCA CGGTTCAAGTG ACCTCCAAGT CGGGTCCCG CGATGTGCTG GAGGGCGTGA
 CGAAGGGAAGT AGCGCTGTAG CCCACCTCAC TTGACCCGAT TGTCGGCTT GGCAAGTCAC TCGAGGTTCA GGCAAGGGCG GCTACACGAC ATCCGGACT
 ATATTCTTT GGCGCTTGTG TGCGATGCTG CTGTAAGG TGTCGAAGGG TCCAACCTCA CCTTCTGTT CACACCTGG TACAACCCCTG CGATTGGCCA
 TATAAGGAAA CCCGGAACTA CACCTAGCAC GACACTTCAC CAAGCTTCCG AGGTGAACT GGAAAGGACAA GTGTCGACCC ATGTTGGAC CGTAAACCGT
 TGTGCACCCG CGTCGGGAGG CGCTGAAATT CCCACCCATC TTCAACACGG TTGACCACTT CCTGTCGGGG CGGGGGGGGG AGCGTCAGAT CATGGGGCTG
 ACACGGCTGG CGCACTTTAA GGGGTGGTAG AGTTGTGAA AACCTGGTAA CGACAGGGGC CGGGGGGGCC TCGCACTCTA CTACCCCCAC
 CGCAATGCCA ATCATGGACA GCTCATGCC CACCTCTTCC CGAGGCTGGG CGTACACGC CGCCTGTTG TCCATGGGCC AGGCAACGAT GAGATGCCAG
 CGGTACCGT TAGTACCTGT CGACTAGGG CGTCAGAAGG CGCTCGACCC CGCATGTCG CGCGAACAC ACGTACCGCG TCCGTGGCTA CTCTACCGTC
 TCCACGGCAC CACCTGGCTG TGGGACCTA AAGAAGACGG CACCATCGAG CATTACACCA TGAGGCTGCA GGACCTTGGC CTGGGGGCT ACACCCCTG
 AGGTGGGGCTG GTGGAACAC ACCCTCGAA TTCTTCTGCC GTGGTAGCTC GTATGTGGT AGCTCGGACT CCTGCAACG GAAACGGGA TGTGGGAAC
 GGATCTCGTG GTGGCCCTG GCACTGAGG CGGGGAGCT ATGCGGCTA CTTTCCGGG CACCCGGCT GATCCACACC CGATGCCCTT CGCTGGCTCC
 CCTAGAGCAC CGACCGGAGC CGTGACTCTT CGGGCTTCA TACGGGGAT GAAAGGGCC GTGGGGGGCA CTACGTGTC CACTACCAA CGGACGCAAG
 CGAGGTGGCA TGTTCATCT CAAACGGGAT GTGGACTCCT TGAACGATGG TGACACAAAG CGCCTTCTT TGCTTECCGA CGGGACCCAC CAGGCATGGT
 CGTCCACGGT ACAAGATAGA GTTCCCGCTA CAGCTGAGGA ACTTCCTACC ACGTGTTTC CGCGGAAACGGA CGCAACGGCT CGCGCTGGTGG CGCCGTACCA

TGCCCAAGCA CGAAGAGATC GATTACTAG AAAAGGAGTC TTCCAATGAC TAGTAATAAT CTGCCACGG TCTTGGAAAG CATCGTGGAG GCTCGTCCCG
 ACCGGTTCTGCTT CTTCTCTAG CTAATGAGTC TTTCTCTAG AACGTTACTG ATCATTATTA GACGGGTGCC ACAACCTTTC GTAGCACCTC CCAGCAGGGC
 GACACCTGGA CGAATTCGGC CCTCCGCATCG CTCACGTGGA TCTGGATGCC CTCACGAAAT CCACCCGCTC TCTGTCGAT TCCCTCAACC AGGGTAAAGGG
 CTCTGGACCT CCTTTAACGG CGAGCGTACG GAGTGCACCT ACACCTACGC GAGGTTTA GCTGGCGAG AGACAAGCTA AGGGAGTTGG TCCCATCCCC
 AGGGGGCGCT TTCATCATGG AGTGCAGTC CCCATCGCCT TCTTTGGGAA TGATTCGTGA CCACTACCAAG CCGGGTGAAA TCGCTCGCGT GACTCTCGC
 TCCCCGGCA AAGTAGTACG TCACGTTAG CGCTACCGGA AGAAACCCCTT ACTAAGCACT CGTGTATGCC GCCCCACTTT AGCGAGGCCA CATGAGAGCG
 TAGCCACCGG CAACTTCCGT CCTGTGCGAG CGGGATCGTT TTGGTGGCGA TTACCGATCAC CTCGCTACCG TTGGCGCTAC CTCTCATCTT CGCGTGCCT
 ATCCGTCCCC CTTAAAGGCA CGACACGCTC GGCGTAGCAA AACCCACCGCT AATGCTACTG GAGCGATGCC AACCCCGATG GAGAGTAGAA CGCCACCGACA
 GCAAGAGACTT CATCATTGAT CCTGTCAGG TACGACCGGC CGCTTACTTT GGTGCTGATC CCATCTGCT CTCGCTCTCT GTCGTTGATC ATGAGAGAGTA
 CGTTCTGAA CTAGTAACCA CGACAGGTCC ATGCTGGCCG CGCGATGAAA CCACCGACTAC GGTAGGACGA CTACGAGAGA CACGAACTAC TACTTCTCAT
 CGACCCACTC GCTGCCGAGG CTGCCCCCTT TGATCTGGAT ATCCCTACCG AGCTTATTGA TGAGGAGGAA CTCCCCCGCC CCATCAACCT CGCTGCCAG
 GCTGCGTACG CGACCGCTCC GACGGGCAA ACTAGACCTA TAGGAGTGGC TCCAATAACT ACTCCCTCTT CAGGGGGGCC CGTAGTTGCA CCCACGCTTC
 ATCTTGGCG TCAACCCACCG CAACCTGCA GATCTGTC TCTGTTTCA CGCTTACCGT CGCCCTCTCA AGCTCATTCC AGCAGATGCC GTCCTCGCT
 TAGAAACCCCTT AGTTGGTGGC TTGGACCGTA CTAGACAGGT AACTAAACCT AGCAACTGCA CGGGACAGGT TCGAGTAAGG TCGTCTACCG CACGAGCACCA
 CTGAGTCTGG CGTGCCGAT ACCGAAACCGG TCCGCCACCT AGGTGGGAC TCCATGCA TCCCTGTTG CTCCAGCTG ACCAGCCAGG AAAACCTGCA
 GACTCAGACCC CGACCCCTA TGGCTTGGC AGGGGTGCA TCCACCCCTG AGTTACGTA AGGACCAACC GAGGGTCCAC TGGTGGTCC TTTGCAACCT
 TCTGGCAGCC CGCGAATTGG TCTACGGGCC CAACAAAGTC TGGGACTCA CCTCACCAAG TCCAGCACAA ACCGGCTGCC CACGGGGTGC CGTCTACGGC
 AGACCGTCCG CGCGTTAACCG AGATCCCCGGG GTTGTTCAG ACCGCTGAGT GGAGTGGTTC AGCTCGTCTT TGGGAGGCC GTCGCCCCACG CGAGATGCC
 CGGCTCATCT TCGAGAGGG ATCGCCACCGT AATGTTTCAC GTGAAACATC CGAAAAAAATC ATCGCCCGAG ACCCAACCTT GCGCTACGTC CGCGTCAAGCC
 CCCGAGTAGA AGCTTCTCGG TAGGGTGC TTAACAACTG CACTTTGAG CGTTTTTAG TAGGGGGCTC TCGGGTTGGA CGCGATGCC AGCGAGTGG

CTGCCACCTC CGGGTACAAG GATTTGCTTC TCCACGGCAT CTTGCCGTA CAAATCCACG CCCCACGTCA GGGCAGCCTC GAGGAGAAA AGGCATTGAT
 CGCGTGGAG CGCCATGTC CTAACGAAAC AGCTCCGTA GAGGGCAT GTTACGTC GGGTGCACGT CGCGTCTTTT TCCGTAACCA
 CGCCGCCCTT CGTGAAGAGG TTGGACGGCA GGTCCAGGTC TCCGGCGCGA TCTCGATGTC CAGCCCCCTG GGGGCTGAAG TCCCAGACGG TGACGTCCAT
 CGCGGCCCA CGACTTCTCC AACCTGGCTT CGACGCTCCG ACCCCCCGGCT AGAGCTACAG CTCCGGGAAC CCCCCACTTC ACCGCTCTCC ACTGCGACCA
 AACGCTTAAATC TTGATGCCA TGAAGGTGG ACCGGGGAAAG TATTCGACTG CGCTACGGTG CGGGGGCTG TGAAGGCAA GTCTTGCCTC CGGGGAGGCC
 TTCGATTAAG AACCTGGGT ACTTCCACCG TCCCGCCCTC ATAAGCTGAC CGGATGCCAC GGGGGGGAC ACTTCCGTT CACAAACGAG CGCCCTCCCT
 TCTCTCCGGA CAACGGCTGG CAGGCACTCG CTGTCGGCTG CGCAGGTTTA GACATCACT CTGGCTGGAA ATACCCCGCC GGTGCAGGCC CGTGGGGCTG
 AGAGAGGCT GTTGCACCC GTCGGTGAGC GACACCCGAC CGGTCACAT CTGTAATGCA GACCCACCT TATGGGGGG CCACGCTCCG CGACCCCGAC
 CGGGGAAAGA TGGGGGGGG CGTGTGAAA TTTTGGGAC CACCTCCACA TTCCATTACT AAAGGTTAA ATAGGATCAT GACTGAAAAA GAAAACTTGG
 CGCCGTTCT ACGGGGGGGG GACGACTTTT AACAGCCCTG CTAGAGGTGT AAGGTAATGA TTCCAAATT TATCCTAGTA CTGACTTTTT CTTTGAAAC
 CGGGCTCACCT GCATACTCG GTGAAATTGG CGGCCAGTTC CGGGGGAAAT CGCTCTGCC TGTCTCGAC CGCTGGAGA AGGCTTCGT
 CGCGGAGCTG CGACGATGGA CGTATGAAAC CACTAACCC CGGGGTCAAG CAGCCCCCTA GGGAGGACGG AGGAGAGCTG GTGACCTCT TCGGAAGCA
 TGACGGGACCC AACACCCAG AGTTCGGCA AGAACCTGGC CGCTACCTCC CGCATTATCT CGGGGGCCCA ACCGGCTGA CGGAATGCCA CAAACCTGCCA
 ACTGCCCTGG TTGTCGGCTC TCAAGGGCT TCTTGACCCG CGGATGCCAG CGCTAATAGA CGCGCCGGGT TGGGGGGACT GGETTACGAG GTGGGAGGG
 CTGGCAGGGG AAGGCAANAGC CTTTGGGGGG ATCTTCTCA AGGGCGAAGA CGCTGTCACG CGGGGTGCCAC AACAAACTAA CGACGTCATC GGGCAGGTC
 CGGGTCCGC TTCCCTTCC GAAAGGGGGG TAGAAGGAGT CGGGCTCTCT CGGAGCAGGTG CGGCCACGTG TGTGTTGATT GGTCCACTAG CGGGTCCACG
 TGCTTGGCAA CGCGATGGGC AAAACCCCGA TCATGGCACA GACGGGGGGCA CGCCAGCAGG CGACGGGGAC CGCTCTGCCA TGTGGGCTCA TGGGGCTCGA
 AGGAACGTT CGCGTACCCG TTGGGGGGT AGTAGGCTCT CGGGCCGGGT CGTGGCTGCG CGGAGGAGCT ACACGGGAGT ACCGGGAGCT
 GTGGGTTGTC TACATGGGG CGAAGGACGT TCCCCGGAG CAGGGCAACG TCTACGGCAT CGAGCTGCCAC CGGGGGAAGG TCAATCCCCGT GCAATCTGGT
 CACCCACAG ATGTAACCCG CGTTCCTGCA ACGGGGGGTC CGGGGGTTC AGATGGCATA CGTCGACCGTG CGGGGCTTCC AGTAGGGGCA CCTTAGACCA

TCGGGCACCC TGAAGGACCC CGTGAATGAA CGGCTGGCC ATTGGACCC AACCTTCCAC GAGTCCCACT ACCTTCTCGG CACCCGGCCC GGGGGGCAAC
 AGGGGGTGGG ACTTCTCGG CCACTTACTT CGCGACGGCC TAACCTGGG TTGGAACGCTG CTCAGGGTGA TGGAAGACCC GTGGGGGGGG CCGGGGGTGG
 CATTECCCAC CTCGTCGCT GAATTCACA AGGTGATCTC TGAGGAAGCC AAGGCACAGA TGCTAGAGCC CACCGCAAG CTTCGGGACG TTCTGGTCC
 GAAAGGGTTG CTAGCACCGA CTTAACGGT TCCACTAGAG ACTCCTTCGG TTCCGCTGCT ACAGATCTCGC CTGGGGGTTC GAAAGGGCTCC AACACAGAG
 CTGCTGGCTCC ACGCCATCGG CATGTTCCG GACTTCATTC ACAGATGAAGG CGTAGACCTC CTGGGGGCTG AGCCAGGGGG TGAAAGGCCTC
 GACACAGCC CCAACGGAGGT TGCGGTAGCC CTGAAACTAAC TGCTACTTCC GCATCTCGAG CAGCCGGCAC TCGGTGGGCC ACTTCCGGAG
 GACTCCGGCA ACCACGGGC AACCACATACC AACGGTACA TGCGGATCTC GCACGGCAC CGTCTCTACC TGATCCGAA CTCCGACGGC CAAGTGGCAAG
 CTGAGGGCGT TTGTGGGGGG TTGGTAGTGG TTGCCAGTCT ACAGGTAGGA CGTGGGGTGG GCAAGGATGG AGTACGGGTT GAGGCTGGCG GTTCACCTTC
 ACTCTTACTC CTCGTCGCCC CGACTTGATT ACCCAGGGT CGGCCACAGC ACAGCACCTC GCACGGCAC CGGGGGCACT ACCTTCTAT CACCGACCC
 TCAGGATGAG CTAGAGGGGG CCTGAACTAA TGGTCCGGC GCGGGTGTG TCCGTTGGA CGTGGGGTGG CGGGGGGTGA TGCAACCATA GTGGCTGGCG
 GAAGCCCTCC AAGCATTCCA GTAGCCTCGC CGCGTACGAA GGCATCATCC CGGGCACTGG ATCTCTACA CGGGTTCGGC TACGACTCA GCGCGGCCAAG
 CTTCGGGAGG TTCTGAAAGGT CATCGGAGGG CGCGATGCTT CGGTAGTAGG CGGCGTGCAC TTAGGAGTCT GCGCAAGGGG ATCTGACTT CGGGGGGTCC
 ACCGGCAAG AGGAAGGCCA GAACTTAACC ATCTCTGCTC CCCTATCCGG CGGTGGGAC AAGGACGTTG ACCATGGCC CGGGCACCCCTC GAAGAAATTC
 TGGGGGCTTC TCCTTCCGGT CTTGAAATTGG TAGGACCCAGC GGGATAGGGC GGCACGGCTG TTCTGCAAC TGCTAGGGGG GCGGTGGGAG CTTCCTTTAG
 CAGAACTGAT CCTGAGGGAC AACCGATGAG CGGTTACGAC GATCTTTTG GCGACGGCTC GACAGGTCA GGGGAGGGGG CTTTGTTC CTTCATCATG
 CTCTTGACTA GGACTTCTC TTGGCTACTC GCGAATGCTG CTAGAAAAAC CGCTGGGAGG CTGTCCTACG TCCCTCCCGC GAAACAAAGG GAAGTACTAC
 CTGAGGGCAC CTTCAACAGA CGAGGCTTTC CAGATCATCT CGACAGCAAT CGAACGTTGC CGAGATGCAC TGAAACTTGG CGTACCTTTC TCCGACCCAG
 GACTCGTGG GAAAGTGGTCT CTCGGAAAGG CTCTAGTACA GGTGTCGTTA GCTTGCACCG CGTCTACGTC ACCTGAAACC GCATGGAAAG AGGCTGGCTC
 TTGCCCCATGG CGGGCACCGTC CGGGAAATCCC ACCTCCGGC ACTCGACGGC GGCACCCACCG TAGACAGGGC ACTCGAGGAG ATCAAGGGGG TCCGACCCAG
 AACGGCTACC CGGGTGGCAG CGCCCTAGGG TGGAGGGGGG TGAGCTGGCG CGGGGGTGGC ATCTGTCGCG TGAGCTGGTC TAGTTCGGCC ACCGGGGTCC

CTACCCAGAG GTTCCCATCG GAATGCTCAT CTACGGCAAC GTTCTTTCA CGGGTGGCTT GGATGCTTC TACCAAGAGT TCGCTGAAGC TGGGGCACAG
 GATGGGTCTC CAAGGGTAGC CTTACCGAGTA GATGCCGTTG CAAGGAAAGT GGGCACCGAA CCTAGCGAAG ATGGTCTCTCA AGCGACTTCC ACCGGCTCTC
 TCCATCTCC TCCAGACGT CCCAGTCGGC GAAGGGCAC CGTTTCTGC ACCACGGGA CTICATCCCA TTACATGCC TCCGGCCAAAC CGCACGGAGA
 AGGTAGGAGG ACGGTCTGCA CGGTCAAGGGC TTCCGGCTG GCAAAAGACG TCGTGGGCT TAACTAGGGT AAATGTAAGGG AGGGGGTTG CGGTGGCTCT
 AAACCCCTCGA CGGTGTCTCC GCGGCATCAA AGGGCTACAT CTACCCATC TCCCGGACG CGGTCAACGG CACCGAACGT GAATCATCCA CGGACGGGCT
 TTTGGGAGCT CCCACAGAGG CGGGCTAGTT TCCCGATGTA GATGCCGTTG AGGGGGCTG CGCACTGGCC GTGGCTTGCA CTAGTGGGT GGCTGGGGAG
 GTCCGGAGTG GTGGACAACA TCAAGAAATT TGATGGGCA CCCATCTCT TGGCTTCGG CGTCTCATCC CCTCAGGACG TGGCAGACCC GATTGGACCC
 CAGGGCTCAC CACCTGTTG AGTTCTTAA ACTACGGCTG GGTAGGAGA ACCCGAAGCC CTGCACTGGG GGAGCTGGC ACCGCTCTGEG CTAACTGTC
 GGTGCTTCCG GTGGGATCAC CGGGTCCGGC ATCACCAAGA TCATTGCTTC CCACGGAA CGTAGGACCC CGAACCCCTC CACCATTCGA GATATGGAC
 CGACGGAAAGG CACGGCTAGTG CCCAACGGGC TAGTGGGTT AGTAAAGAG GGTGACGCTT CCACCTGTC GCTTGGGAG GTGGTAAGCT CTATACCTGC
 GTTTGAAGA GGATCTCACT GAGTTCTACT CTGGGACTGAG AGGGCACGGAC CAAGAACGGT TAGGCTTTA AAATGTCGAA TGTTTCACGT GAAACATTCT
 CAACATTCTT CCTAGAGTGA CTCAAGTACA GACGCTGACT TCCGTCGCTG GTTCTTCAA ATCCGGAAAT TTACACGGT ACAGTGGCA CTTTGTAAAGA
 GAGAGAATGT AGAACATCA AAGAACCCAC CTCCCTAGCTC TCGGGCTGGG AGGGGGCTTC TTGTTTGGG GTTACGGAA TCTCAGGGTT TTGCAAGATCT
 CTCTCTTACA TCTTCTAGT TTCTTGGCTG GAGGATCGAG AGGGGGACCC TCCGGGAGG AAACAAACGC CAAATCTTT AGAGTCCCAA AACCTCTAGA
 TAGCTTGGAG CGGGTGGGGT AGGAGGGCCC CGGGGGAGGAG CAATCTTACG CTAGGCTCCG GCGGGAGGG TTGGAGTGGC ATCACGGTCC CGCTTGGGCA
 ATCCGAGCTG CGGGCACCCCA TCCCTGGGG CGGGCTCCCTC GTTAAATCC CATCAGGGT CGGGGGTGGC AACCTCACCG TAGTGCAGG CGGAAGAGGT
 CGGGGGTACG GTTGGGAGCT GGATCC
 CGGGGGATGC CAACCTCGA CCTAGG

2) 特許請求の範囲第1項記載の各種領域よりなる群から選ばれる1以上よりなるDNA。

3) DNAが人工的に合成されたDNA又は微生物に由来するDNAである特許請求の範囲第1項又は第2項記載のDNA。

4) 微生物がコリネ型細菌である特許請求の範囲第3項記載のDNA。

5) 微生物がブレビバクテリウム属に属する微生物である特許請求の範囲第3項記載のDNA。

6) 微生物がブレビバクテリウム・ラクトフェルメンタムに属する微生物である特許請求の範囲第3項記載のDNA。

7) DNAが1部置換、変異又は削除されたDNAである特許請求の範囲第1項ないし第6項記載のDNA。

8) DNAがプラスミド又はファージ由来のベクターに組込まれたDNAである特許請求の範囲第1項ないし第7項記載のDNA。

9) 特許請求の範囲第2およびまたは8項記載のDNAを用いるレートリブトファンの製造法。

10) 下記第2式ないし第7式のアミノ酸配列をもつペプチド又は蛋白(第2式ないし第7式中A アラニン、C システイン、D アスパラギン酸、E グルタミン酸、F フェニルアラニン、G グリシン、H ヒスチジン、I イソロイシン、K リジン、L ロイシン、M メチオニン、N アスパラキン、P プロリン、Q グルタミン、R アルギニン、S セリン、T スレオニン、V バリン、W トリプトファン、Y チロシンを示す)。

なお、第2式はトリプE酵素、第3式はトリプG酵素、第4式はトリプD酵素、第5式はトリプC酵素、第6式はトリプB酵素、第7式はトリプA酵素のアミノ酸配列を示す。)。

第 2 式

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
MSTNPVVFSL DRYHEDASA LFAHLCGTTA DDAALLESAD ITTKNGISSL AVLKSSVRIT CTGNTVVTQD LTDSCRAVVA RLTOQLGQYN TAENTFSPPA									
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
SDAVDVEREBL TAPSTIEVLR KLOFESGYSD ASLPLLMGCF AFDPLETPET LPAVEESVNT YPDYQPVLAQ IVLDINHQDQ TAKLTGVSNA PCELEAEELNK									
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
LSLLIDAAALP ATERAYGTTP HDGDTLRRVVA DIPDAQFRTO INELKENIYN GDIYQVVPAR TFTAPCPDAF AAYLQLRATHM PSPYMFYIRG LNEGRSYELF									
310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
GASPESHNLKF TAANRELQY PIAGTRPRCL NPDGSINDEL DIRNELDHRT DAKEIADDTM LVDLARNDLA RVSVPASRRV ADLLOVDRYS RVMMHLVSRVT									
410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
ATLDPEDAL DAYRACHHMG TLTGAPKLRA MELLRGVEKR RRGSYGGAVG YLRGNGDMD CIVIRSAFVQ DGVAAVQAGA GVVROSNPQ EADETLHKAY									
510	520								
AVLNAAJALAA CSTLEVIR									

第 3 式

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 MTHVVLIDNH DSFVYHNLVDA FAVACYKCTV PRNTVPVETI LAANPDLICL SPCPGYPADA GMMALIERT LGQIPLLCIC LGYQALIEYH GCKVEPCGPV
 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 HCTTDWMLT DAGVQSPVFA GLATDVEPDD PEVPGRKYPI GRYHSLGCVV APDGIESLGT CSSEICDVIM AARTTDGKAJ GLOFHPESVL SPTCPILSR
 210
 CVEOLLAN*

第 4 式

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 MTPATLKV LAYLDNPTPT LECATEVPTP LTVGEYDDVH IAALLATIRT RGEOFADIG AAKAFLAAAR PFPITGACLL DSAGTGGDGA NTINITTGAS
 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 LIAASGGVKL AKHGNRSVSS KSGSAADVLEA LNTPLGLDVD RAVKWFESN FTPLFTPAYH PAIAHVQPVR QALKPPTIFN TLGPLLSPAR PERQINGVAN
 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 ANHGQLIAEV FRELGRTRAL VVHGACTDEI AVHCTTLVWE LKEDCTIEDY TIEPEDLGLG RYTLEDLVCG LTCENAEAMR ATFACTGPDA HRDALAASAG
 310 320 330 340 350
 AMPYLNQDVD SLKDGAOKAL SLLADATTOA WLAKBEEIDY SEKEESSND*

第 5 式

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 MTSNNLPTVL ESTIVEGRRH LEEIRARIAD VDVLALPKST RSLFOSLNQG RGGARFIMEC KSASPSLGHY REHYQPGCIA RVYSRYAAAI SVLCEPDRFG
 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 GDYDHLATVG ATSHLPVLCK DFIIDPVQVR PARYFGADAI LLMLSVLDEE EYDALAAEAA RFDLIDLTVE IDEEEVARAI KLGAKIFGVN HRNLHDLSID
 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 LDRSRRLSKL IPADAVLVSE SGVROTETVR QLGGSNAFL VGSQLTQEN VOLAARELVY GPNKVCGLTS PSAAQTARAA GAVYCGGLIFE EASPRNVSE
 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
 TSOXKIIAEP NLBYVAVSRR TSGYEDLLYD GJFAYQHAP LOGSVEAEKA LIAAVREEVG PVOVWRAIS MSSPLGAEVA EGDVOKLILD AHEGGSGEVF
 410 420 430 440 450 460 470 480
 DWATVPAAVK AKSLLAGGIS PDNAAQALAV GCAQDINSG VEYPACACTW CWGECRRAA ENFRDULRIP LLKV *

第 6 式

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 MTEKENLGG S TLLPAYFCGF CGDFVNAESLL PALDOLEKAF YDATHNSPEFR EELCCYLRDY LGRPTPLTEC SNLPLACEGX CFARJFLKRE DLVHGGAHET
 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 NOVIGOVLLA KRMGKTRITIA ETGAGOBGTA TALACALMGL ECVVYMGAKD VARQOPNVYR MOLBGAKVTP VESGSGTLKD AVNEALRDMT ATFHESHYLL
 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 GTRAGPHPPF TIVREFHKVI SEEAKAQMLE RTGKLPDVVV ACVGGGSNAI GMFAFDIFDDE GVELVGAEP A GECLOSGKNG ATITHGQIGI LNGTRSÝLMR
 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
 NSDCQVEEESTY SISAGLDYPC VGHSTHICTP PARTTLVSPV PKPSKHNSSL ARYEGCIPRT GILTRVRLRL KRAKTAEEBG QNLTILVSL S CRGDKDVKDHR
 410 420
 AGTLEEKPEL ILKDRN

第 7 式

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 MSRYDDLFGD ASTRSGECAF VPFIMLSDPS PEEAFQIIST AIERGADALE LCVPPSDPVA DGPTVAESHL RALDGGATVD SALEQIKRVR AAYPEVPICH
 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 LIYCHVPPFTT GLDRFYDEFA EACADSILLP DVPVREGAPP SAAACIDPIY IAPAHASEKT LEGVSAASKG YIVAIISROCV TCTERESSTD GLSAVVDNIK
 210 220 230 240 250 260 270 280 290
 KFDGAPILLG FCISSPOHVA DATIAGASGA ITGSAITKII ASHCEGEHPN PSTIRDMDGL XKDLTEFISA TECSDDECLG L

11) アミノ酸配列が一部置換、変異、又は削除されたアミノ酸配列である特許請求の範囲第10項記載のペプチド又は蛋白。

12) 特許請求の範囲第10項ないし第11項記載のペプチド又は蛋白をコードするDNA。

13) 特許請求の範囲第1項及び又は第7項記載のプロモーター領域の配列を有するDNAを用いる遺伝子発現法。

14) 特許請求の範囲第1項及び又は第7項記載のオペレーター領域の配列を有するDNAを用いる遺伝子発現法。

15) 特許請求の範囲第1項及び又は第7項記載のアティニエーターおよび、またはリーダーペプチド領域の配列を有するDNAを用いる遺伝子発現法。

16) 特許請求の範囲第1項及び又は第7項記載のターミネーター領域の配列を有するDNAを用いる遺伝子発現法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、組換えDNA法によるレトロビリトフ

アンの生産菌の分子育種や生理活性ペプチドの生産に応用可能なコリネ型細菌の、さらに限定すればブレビバクテリウムの、トリプトファンオペロンを含むDNA配列とそこにコードされるアミノ酸配列に関する。

本発明にいうコリネ型細菌 (Coryneform bacteria) は、バージース・マニュアル・オブ・データーミネイティブ・バクテリオロジー (Bargy's Manual of Determinative Bacteriology) 第8版 599頁 (1974) に定義されている一群の微生物であり、好気性、グラム陽性、非抗酸性、胞子形成能を有しない桿菌である。このようなコリネ型細菌のうち特に以下に述べるようなコリネ型グルタミン酸生産性細菌が本発明においては、最も好ましいものである。

コリネ型グルタミン酸生産性細菌の野性株の例としては次のようなものがあげられる。

ブレビバクテリウム・ディバリカタム

ATCC 14020

ブレビバクテリウム・サッカロリティクム	ATCC 14066
ブレビバクテリウム・インマリオフィルム	ATCC 14068
ブレビバクテリウム・ラクトフェルメンタム	ATCC 13869
ブレビバクテリウム・ロゼウム	ATCC 13825
ブレビバクテリウム・フラバム	ATCC 13826
ブレビバクテリウム・チオゲニタリス	ATCC 19240
コリネバクテリウム・アセトアシドフィルム	ATCC 13870
コリネバクテリウム・アセトグルタミカム	ATCC 15806
コリネバクテリウム・カルナエ	ATCC 15991
コリネバクテリウム・グルクミカム	ATCC 13032, 13060
コリネバクテリウム・リリウム	ATCC 15990
コリネバクテリウム・メラセコーラ	ATCC 17965

ミクロバクテリウム・アンモニアフィラム
ATCC 15354

本発明のコリネ型グルタミン酸生産性細菌には上記のようなグルタミン酸生産性を有する野性株のほかにグルタミン酸生産性を有するまたはグルタミン酸生産性を失った変異株も含まれる。

ここでいうトリプトファンオペロンとは、プロモーター、およびアティュエーター、さらにリーダーベブチドをコードする領域 (*trpL*)、アンスラニル酸シンターゼ遺伝子 (*trpE*, *trpG*)、ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺伝子 (*trpD*)、N-(5'-ホスホリボシル)アンスラニル酸イソメラーゼ-インドール-3-グリセロールリン酸シンターゼ遺伝子 (*trpC*)、トリプトファンシンターゼ遺伝子 (*trpB*, *trpA*)の各構造遺伝子が隣接して配置され、一つの転写単位として機能しているものをいう。

各構造遺伝子を単離する方法は、コリネ型細菌のトリプトファンオペロン、或いは、各構造遺伝子を有している株より、まず染色体遺伝子を抽出

し（例えばH. Saito and K. Miura *Biochem. Biophys. Acta* 72, 619 (1963) の方法が使用できる。）、これを適当な制限酵素で切断する。ついで微生物細胞内で複製し得て、かつプロモーター活性をもつベクターに接続し、得られた組換えDNAを用いて、コリネ型細菌もしくはその他の微生物で、トリプトファン合成系の構造遺伝子が変異を受け、酵素が活性を失ない、そのためにトリプトファン要求性を示すようになっている変異株を形質転換し、該酵素活性が回復、上昇し、トリプトファン要求性が消失する菌株を採取し、これより該構造遺伝子をもつ複合プラスミドを分離できる。

このような方法でも、幸運にしてオペロン全域を単離できる場合もあるが、もしもオペロン全域を単離（クローン化）できなかった場合は、上述の方法により分離した各構造遺伝子の一部もしくは全部をアイソトープ等でラベルしそれらをプローブにして、プラスミドもしくはファージベクターを用いて作成したコリネ型細菌の染色体遺伝子のジーンバンクからコロニーハイブリダイゼイシ

ョンにより、単離可能である。

染色体遺伝子を切断するには、切断反応時間等を調節して切断の程度を調節すれば、巾広い種類の制限酵素が使用できる。

本発明のうちトリプトファンオペロンもしくはその一部をトリプトファンの生産に使用する場合に用いるベクターは、コリネ型細菌細胞内もしくは *E. coli*, *B. subtilis*において増殖し得るものであればどのようなものでも良い。具体的に例示すれば、以下のものがあげられる。

- (1) pAM 330 特開昭58-67699 参照
- (2) pAM 1519 特開昭58-77895 参照
- (3) pAJ 655 特開昭58-192900 参照
- (4) pAJ 611 同 上
- (5) pAJ 1844 同 上
- (6) pCG 1 特開昭57-134500 参照
- (7) pCG 2 特開昭58-35197 参照
- (8) pCG 4 特開昭57-183799 参照
- (9) pCG 11 同 上
- (10) pCC 1 特開 (Mautio/Ajico)

(11) pBL 100 特開 ()
 (12) pBR 322
 (13) pC 194

ベクターDNAの開裂は、当該DNAを一箇所で切断する制限酵素を用いて切断するか、複数部位を切断する制限酵素を用いて部分的に切断することにより行う。

ベクターDNAは、染色体遺伝子を切断した際に用いられた制限酵素により切断され、または染色体DNA切断フラグメント及び切断されたベクターDNAのそれぞれの両端に相補的な塩基配列を有するオリゴスクレオチドを接続せしめて、ついでプラスミドベクターと染色体DNAフラグメントとのライゲーション反応に付される。

このようにして得られた、染色体DNAとベクターとの組換えDNAをコリネ型細菌に属する受容菌へ導入するには、エシェリヒア・コリK-12について報告されている様な(Mandel, M. and Niga, A., J. Mol., Biol., 53, 159(1970))受容菌細胞を塩化カルシウムで処理してDNAの透過性を増す方

グリコールまたはポリビニルアルコールと二価金属イオンとの存在下にDNAをとり込ませる方法も当然利用できる。ポリエチレングリコールまたはポリビニルアルコールの代りに、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、フィコール、ブルロニックF68(セルバ社)などの添加によってDNAのとり込みを促進させる方法でも同等の結果が得られる。

クローニングしたトリプトファンオペロン、或いは各構造遺伝子を用いてトリプトファン生産菌の分子育種を行うには、遺伝子のクローニングの際に用いたトリプトファン要求性の変異株を宿主として形質転換した株を用いることができるが、以下に示すような宿主を用いればよりトリプトファンの生産性が高い菌株が得られることがある。

プレビバクテリウム属のフェニルアラニン、チロシンを要求し、5-メチルトリプトファンに耐性を有する変異株(I. Shio, H. Sato, M. Nakagawa, Agric. Biol. Chem., 36, 2315(1972))、プレビバクテリウム属のフェニルアラニンを要求し、m-フ

法、またはバチルス・ズブチリスについて報告されている様に(Duncan, C. H., Wilson, G. A. and Young, F. E., Gene, 1, 153(1977))細胞がDNAを取り込み得る様になる増殖段階(いわゆるコンピメントセル)に導入する方法により可能である。あるいは、バチルス・ズブチリス、放線菌類および酵母について知られている様に(Chang, S. and Cho, S. N., Molec. Gen., Genet., 168, 111(1979); Bibb, M. J., Ward, J. M. and Hopwood, J. A., Nature, 274, 398(1978); Hinnen, A., Hicks, J. B. and Prink, G. R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929(1978))、DNA受容菌を、プラスミドDNAを容易に取り込むプロトプラストまたはスフェロプラストにして組換えDNA受容菌に導入することも可能である。

プロトプラスト法では上記のバチルス・ズブチリスにおいて使用されている方法でも充分高い頻度を得る事ができるし、特開昭57-183799に記載されたコリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属のプロトプラストにポリエチレン

ルオロフェニルアラニン、5-フルオロトリプトファンに耐性を有する変異株(I. Shio, S. Sugimoto, M. Nakagawa, Agric. Biol. Chem., 39, 627(1975))、プレビバクテリウム属のチロシンを要求し、5-フルオロトリプトファン、アバセリンに耐性を有する変異株、コリネバクテリウム属のフェニルアラニン、チロシンを要求し、5-メチルトリプトファン、4-メチルトリプトファン、6-フルオロトリプトファン、トリプトファンヒドロキサメート、p-フルオロフェニルアラニン、チロシンヒドロキサメート、フェニルアラニンヒドロキサメートに耐性を有する変異株(H. Hagiwara, K. Nakagawa, Agric. Biol. Chem., 39, 345(1975))等がある。

このようにして得られたトリプトファン生産能を有するコリネ型細菌を培養してトリプトファンを生成蓄積せしめる方法は、従来コリネ型細菌によるトリプトファンの製造のために使用されていた方法と特に大きく違う点はない。即ち、培地としては、炭素源、窒素源、無機イオン、更に必要

に応じアミノ酸、ピタミン等の有機微量栄養素を含有する通常のものである。炭素源としては、グルコース、シュクロース、ラクトース等及びこれらを含有する澱粉加水分解液、ホエイ、糖蜜等が用いられる。窒素源としては、アンモニアガス、アンモニア水、アンモニウム塩その他が使用できる。

培養は好気的条件下で培地のpH及び温度を適宜調節しつつ、実質的にトリプトファンの生産蓄積が停止するまで行なわれる。

トリプトファン生産菌の分子育種に加え、さらに、本発明によって得られるもう一つの大きな利点は、プレビバクテリウムのトリプトファンオペロンのプロモーターがE.coliのトリプトファンオペロンのプロモーターと同等成いはそれ以上の強い活性を有し、かつその末尾の構造から予測される様に強いターミネーターを有しており、またコリネホルム型細菌においてトリプトファンにより発現調節を受けるオペレーターを有していることである。E.coliでの異種遺伝子例えは、インク

ーフェロン、成長ホルモン、インターロイキン、神経成長因子、或いはその他生理活性ポリペプチド又は酵素等の発現又は異種蛋白の過剰生産においては、E.coliトリプトファンプロモーター、オペレーター、及びターミネーターが繰用されている。即ち、本発明によって得られたトリプトファンオペロンは、コリネホルム型細菌におけるレートリプトファン生産菌の分子育種を勿論促進するが、さらにE.coli系、或いは他のコリネホルム型細菌における遺伝子の強力な発現、及びその調節を行い得るプロモーター、オペレーター、及び、ターミネーターを有するものであり、このDNA配列を用いて上記の異種遺伝子を強力に発現し、過剰生産することが可能である。

また、本発明のDNA配列のうち、遺伝子の発現に関与する部分であるプロモーター領域、オペレーター領域、アテニュエーター領域ならびにリボソーム結合領域の塩基配列、及びターミネーター領域の塩基配列を各自単独で、或いはいずれかを組合せた形で（取り出して）使用する場合、あ

るいは、各酵素の構造遺伝子の塩基配列について、コードされたアミノ酸配列が異なるように置換して得たDNA配列も、更にいえば、本発明のDNA配列の任意の部分の塩基を他のものと置換したり、新たに塩基を挿入したり、又は削除した場合、或いは、塩基配列の一郎を転位させた場合に得られる誘導体およびそれにコードされるアミノ酸配列の蛋白も、いずれも遺伝子の発現及びレートリプトファン生産菌の分子育種に良好な結果を与えるものと想定され、主要部分を本発明に依存する技術として本発明の範囲に入るものである。

以下、具体例によって本発明のDNA配列を含むプレビバクテリウムラクトフェルメンタムのトリプトファンオペロンの取得方法、及び本発明のDNAの塩基配列の決定とアミノ酸配列の決定、並びに本発明のDNAを用いて形質転換して得られるコリネ型細菌によるレートリプトファンの生産およびプロモーター、オペレーターについて説明する。

実施例1.

アンスラニル酸シンターゼ遺伝子、ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺伝子、トリプトファンシンターゼβサブユニット遺伝子のクローニング

1-1 プレビバクテリウムラクトフェルメンタムのトリプトファンオペロンを含む染色体DNAの調製

プレビバクテリウム・ラクトフェルメンタムAJ11225(PERM-P4370)を1LのCHG培地（ペプトン1g/dl、酵母エキス1g/dl、グルコース0.5g/dl、及びNaCl 0.5g/dlを含み、pH7.2に調整したもの）に植菌し、30℃で約3時間振盪培養を行ない、対数増殖期の菌体を集めた。

この菌体をリゾチーム・SDSで溶菌させたのち、通常のフェノール処理法により、染色体DNAを抽出精製し、最終的に3.5mgのDNAを得た。

1-2 ベクターDNAの調製

ベクターとしてpAJ1844（分子量5.4メガダルトン）を用い、そのDNAを次の様にして調製した。

まずpAJ1844をプラスミドとして保有するプレビバクテリウム・ラクトフェルメンタムAJ12037を100mLのCMC培地に接種し、30℃で対数増殖期後期まで培養したのち、リゾチームSDS処理により溶菌させ、30,000×g、30分の超遠心により上清を得た。フェノール処理ののち、2容のエタノールを加えてDNAを沈殿回収した。これを少量のTEN緩衝液(20mMトリス塩酸塩、20mM NaCl、1mM EDTA(pH 8.0))に溶解後、塩化セシウム-エチジウムプロミド密度勾配平衡遠心によりプラスミド画分を分離し、最終的にpAJ1844プラスミドDNA約200μgを得た。

1-3 染色体DNA断片のベクターへの挿入

1-1 で得た染色体DNA 10μgと1-2で得たプラスミドDNA 5μgとを制限エンドヌクレアーゼPst Iでそれぞれを37℃に1時間保持し、切断した。65℃に10分間加熱した後、両反応液を混合し、ATP及びジチオスレイトール存在下、T4ファージ由来のDNAリガーゼによって10℃に24時間保持しDNA鎖を連結せしめた。ついで

を集め、菌体を0.5Mシューカロース、20mMマレイン酸、20mM塩化マグネシウム、3.5%ベナッセイブロス(Difco)からなるSMMP培地(pH 6.5)0.5mLで洗浄した。次いで10mg/mLのリゾチームを含むSMMP培地に懸濁し30℃で20時間プロトプラス化を図った。6000×g、10分間遠心分離後、プロトプラスをSMMPで洗浄し0.5mLのSMMPに再度懸濁した。この様にして得られたプロトプラスと1-3で調製したDNA 10μgを5mM EDTA存在下で混合し、ポリエチレングリコールを最終濃度が30%になる様に添加した後、DNAをプロトプラスに取り込ませるために室温に2分間放置した。このプロトプラスをSMMP培地1mLで洗浄後、SMMP培地1mLに再懸濁し、形質発現のため、30℃で2時間培養した。この培養液をpH 7.0のプロトプラス再生培地上に塗布した。プロトプラス再生培地は蒸留水1Lあたりトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン1.2g、KCl 0.5g、グルコース1.0g、MgCl₂·6H₂O 8.1g、CaCl₂·2H₂O 2.2g、

反応液を、65℃にて5分間加熱し、反応液に2倍容のエタノールを加えて連結されたDNAの沈殿を採取した。

1-4 アンスラニル酸シンターゼ遺伝子、ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺伝子、及びトリプトファンシンターゼβサブユニット遺伝子のクローニング

プレビバクテリウムラクトフェルメンタムのアンスラニル酸シンターゼ欠損株AS60、ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ欠損株No.38、トリプトファンシンターゼβサブユニット欠損株No.30(いずれもAJ12125を親株とし、N-メチル-N-ニトロ-N-ニトロソグアニジンにより変異処理することにより分離した)をDNA受容菌として用いた。

形質転換の方法としては、プロトプラストランスフォーメーション法を用いた。まず、菌株を5mLのCMC液体培地で対数増殖期の初期まで培養し、ベニシリングを0.6ユニット/mL添加後、さらに1.5時間振盪培養し、遠心分離により固体

ペプトン4g、粉末酵母エキス4g、カザミノ酸(Difco社)1g、K₂HPO₄ 0.2g、コハク酸ナトリウム13.5g、寒天8g及びクロラムフェニコール3μg/mLを含む。

30℃で2週間培養後、各受容菌について各々約25000個のクロラムフェニコール耐性コロニーが出現してきたのでこれを最少培地(2%グルコース、1%硫酸アンモニウム、0.3%尿素、0.1%りん酸二水素カリウム、0.04%硫酸マグネシウム7水塩、2ppm鉄イオン、2ppmマンガンイオン、200μg/Lサイアミン塩酸塩、50μg/Lビオチン、カザミノ酸(Difco)3g/L、クロラムフェニコール10μg/mL、pH 7.0、寒天1.8%)にレプリカし、クロラムフェニコール耐性でかつトリプトファン要求性の消失した株をAS60を用いた区分から2株、No.38を用いた区分から1株、No.30を用いた区分から1株得た。

上記5株からプラスミドを抽出したところ、いずれのプラスミドもベクター-プラスミドpAJ1844よりも明らかに大きく、AS60を用いた区分から得

た組換えプラスミドをptrpE36、ptrpE4、Nb38を用いた区分から得た組換えプラスミドをptrpD3851、Nb30を用いた区分から得た組換えプラスミドをptrpB301と名付けた。

1-5 再形質転換

1-4で得た組換えプラスミドptrpE36、ptrpE4、ptrpD3851、ptrpB301上に各々アンスラニル酸シンターゼ遺伝子、ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺伝子、トリプトファンシンターゼβサブユニット遺伝子が存在することを確認するため、ptrpE36、ptrpE4をNb60に、ptrpD3851をNb38に、ptrpB301をNb30に再度形質転換した。

生じたクロラムフェニルコール耐性コロニーのうちそれぞれ10個を釣り上げ、トリプトファン要求性を調べた。その結果、いずれもが要求性を消失しており、ptrpE36、ptrpE4、にはアンスラニル酸シンターゼ遺伝子が、ptrpD3851には、ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺伝子が、ptrpB301にはトリプトファンシンターゼ

βサブユニット遺伝子が存在することが明らかになった。ただしptrpE4の形質転換株では栄養要求性の消失の程度、及び最少培地上でのアンスラニル酸の蓄積がptrpE36の形質転換株に比較して悪く、ptrpE4にはアンスラニル酸シンターゼの遺伝子の一部が欠けているのではないかと示唆された。

1-6 組換えプラスミドの挿入DNA断片の制限酵素地図の作製

実施例1-2で用いた方法により組換えプラスミドptrpE36、ptrpE4、ptrpD3851、ptrpB301を調製し、常法に従い各種制限酵素で切断し挿入DNA断片の制限酵素地図を作製した(第1図)。

実施例2

ブレビバクテリウムラクトフェルメンタムのトリプトファンオベロン全域のクローニング
ブレビバクテリウムラクトフェルメンタム
AJ11225から自然突然変異により分離した5-フルオロトリプトファン抵抗性のNb1041(トリプトファンによるアンスラニル酸シンターゼのフィー

ドバック阻害が解除した株)から実施例1で示した方法により染色体DNAを調製し、制限酵素BamHI或いはSalI、又はXbaIで完全に切断し、*E.coli*のベクターpUC18(Messing,J.,et al.,Gene,33,103-119(1985))の各制限酵素切断部位に連結し、*E.coli*JM109(Messing,J.,et al.,Gene,33,103-119(1985))を形質転換し、X-Gal(5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-galactoside),IPTG(isopropyl-β-D-thio-galactopyranoside)、アンビシリソを含むL寒天培地にプレーティングした。37℃で24時間培養後出現した白色コロニー(合計約1500コロニー)をニトロセルロースフィルター上に釣り上げた。実施例1で得たアンスラニル酸シンターゼ遺伝子(trpE)を有するptrpE36の1.2kbのPstI挿入断片をプローブにして、コロニーハイブリダイゼイション(Granstein,M.,Walls,J.:Methods in Enzymology,68,379,Academic Press Inc.,New York(1979))を行ない制限酵素BamHIを用いた区分から1つ、制限酵素SalIを使用した区分から1つのポジティブコロ

ンを得た。BamHI区分から得た組換えプラスミドをptrpE97、SalI区分から得たプラスミドをptrpE42と名付け、実施例1で示した方法に挿入DNA断片の制限酵素切断地図を作成した(第1図)。

その結果、ptrpE97はptrpE36、~~ptrpD3851~~、ptrpB301の挿入PstI断片と同じ制限酵素地図を有するPstI断片を有しており、ptrpE42はptrpE36、~~ptrpD3851~~のPstI断片及び~~ptrpE97~~のPstI断片の一部と同じ制限酵素地図を有していることが明らかとなった。又、ptrpE97とptrpE42は共通のBamHI-SalI断片を有していた。

実施例3

N-(5-ホスホリボシル)アンスラニル酸イソメラーゼ-インドール-3-グリセロールリシン酸シンターゼ遺伝子(trpC)のサブクローニング及びトリプトファンシンターゼのサブユニット遺伝子(trpA)のサブクローニング
第1図の組換えプラスミドの挿入DNA断片の制限酵素地図の比較からtrpD遺伝子とtrpB遺伝子の間にtrpC遺伝子が、trpB遺伝子の下流にtrpA遺伝

子が存在するのではないかと考えられていた。そこで各遺伝子の存在を確認するため以下の実験を行った。

3-1 *trpC*遺伝子のサブクローニング

組換えプラスミド *ptrpE97* から第1図に示した約2 kb. の *Sst*I-EcoRI断片を分離し、*Sst*I, EcoRI で切断した *pUC19* (Messing, J., et al., Gene, 33, 103-119, 1985) に連結し、*lac* プロモーターからの転写が可能になるように配置した。或いは第1図の約2.6 kb. の *Sst*I-Hind III断片を分離し *Sst*I, Hind IIIで切断した *pUC18* (Messing, J., et al., Gene, 33, 103-119, 1985) に連結し、*lac* プロモーターからの転写が可能になるように配置し、*E. coli* CGSC No 5889 (*trpC60*, *pyrF287*, *hisG1*, *lacZ53*, *rpsL8*, λ^-) を形質転換した。その結果、*Sst*I-EcoRI断片、或いは *Sst*I-Hind III断片を有する組換えプラスミドは、*E. coli* の要求性を消失させた。

3-2 *trpA*遺伝子の存在の確認

組換えプラスミド *ptrpE97* から第1図に示した

約2.4 kb. の *Nru*I-BamHI断片を分離し、*Sst*I, BamHI で切断した *pUC18* に連結し、*lac* プロモーターからの転写が可能になるように配置し、*E. coli* CGSC No 5644 (*trpA33*, *rha-T*, λ^-) を形質転換した。その結果、*Nru*I-BamHI断片を有する組換えプラスミドを保持する形質転換株では、トリプトファン要求性の消失が認められた。

実施例4.

トリプトファンオペロンの塩基配列の決定

実施例1で得られた *ptrpE36*、*ptrpD3851*、*ptrpB301* 及び実施例2で得られた *ptrpE97* を有する形質転換株から各々プラスミドの調製を行った。各々のプラスミドの挿入DNA断片について *pUC18* 或いは *pUC19* 又は *M13mp10* (Messing, J. and Vieira, J., Gene 9, 269 (1982)) を用いる dideoxy chain termination 法 (Sanger, F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463 (1977)) により第2図に示した塩基配列決定のための戦略図によって、トリプトファンオペロン全塩基配列を決定した。その結果、次に示すDNA塩基配列が得られ、この塩基配

列はブレビバクテリウムラクトフェルメンタムのトリプトファンオペロンの発現に必要なRNAポリメラーゼの結合部位 (*trp* プロモーター)、リボゾームの結合部位、アンスラニル酸シンクターゼ遺伝子 (*trpE*, *trpG*)、ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺伝子 (*trpD*)、N-(5-ホスホリボシル)アンスラニル酸イソメラーゼインドール-3-グリセロールリン酸シンクターゼ遺伝子 (*trpC*)、トリプトファンシンクターゼ遺伝子 (*trpB*, *trpA*) に対応するDNA配列、及び停止配列 (ターミネーター) を含むことが判明した。

又、プロモーターと *trpE*構造遺伝子との間は、転写レベルでの発現調節機構であるリプレッシャーに閲与するオペレーター領域及び翻訳レベルでの発現調節機構アティニュエーションに閲与するリガーベプチド (*trpL*) をコードする領域とアティニュエーター様構造が存在する領域が存在すると推定された (第3図)。ターミネーターの構造は第6図に示した。

実施例5.

プロモーターの単離と活性確認

塩基配列の決定の結果、推定されたトリプトファンオペロンのプロモーターを単離し、その機能を確認するため、第4図に示したように、*ptrpE97*、或いは *ptrpE36* の EcoRI-Hind III断片 (約550 bp.) を *E. coli* のプロモーター-プローブベクター-pKK175-6 (アンビシリン耐性 (*A* p)、テトラサイクリン (*Tc*) 感受性) (Brosius, J., Gene 27, 151 (1984)) にサブクローニングした。得られた組換えプラスミド *ptrpP01* は *E. coli* 中で *Tc* 耐性を発現した。

さらに、pAM330 由来のトリメトブリム耐性のベクター、pAJ226の *Pst*I 切断部位に *Pst*I で切断した上記組換えプラスミド *ptrpP01* を連結し、ブレビバクテリウム AJ11225 を形質転換したところ *Tc* 耐性の発現が認められた。この組換えプラスミド *ptrpP02* を有する形質転換株の *Tc* 耐性度は第1表に示したように、*trp* 存在下では *Tc* に対する感受性が増した。従ってこの領域には、プロモーターとオペレーターが存在すると考えられる。

第1表 クロラムフェニコール耐性菌におけるトリプトファン生産

菌株	トリプトファン耐性度 (μg/ml)	
	トリプトファン無添加	トリプトファン添加 (1 mg/ml)
ptrpP01 in <i>E. coli</i>	2.0	2.0
ptrpP02 in <i>Brevibacterium lactofermentum</i>	2.5	5
ptrpP03 in <i>E. coli</i>	2.0	2.0
ptrpP04 in <i>E. coli</i>	2.0	2.0
ptrpP05 in <i>E. coli</i>	6.00 <	6.00 <
ptrpP06 in <i>E. coli</i>	6.00 <	6.00 <
peB003TR in <i>E. coli</i>	4.00	2.00

*pE8003TRは*E. coli*のトリプトファンプロモーターを有している

スミドpAJ234を用いて、レートリプトファン生産について検討した。

pAJ234を用い、m-フルオロフェニルアラニン及び5-フルオロトリプトファン耐性株ブレビバクテリウム・ラクトフェルメンタムM247を用いて述べた方法により形質転換し、クロラムフェニコール耐性を指標として形質転換株を選択した。かくして得られたAJ12195(PEM-P8014)を培養し、トリプトファン生産能を調べたところ第2表に示す結果を得た。

培養はトリプトファン生産培地(グルコース13.0g、(NH₄)₂SO₄2.5g、フマル酸1.2g、酢酸3.0g、KH₂PO₄1g、MnSO₄·7H₂O1.0g、MgSO₄·7H₂O1g、d-ビオチン5.0μg、サイアミン塩酸塩2000μg、メチオニン400μg、チロシン650μg、大豆蛋白酸加水分解液「味液」5.0ml、CaCO₃5.0gを水1Lに含む、pH6.5.)2.0mlを500mlの坂口フラスコに入れたものに被検菌株を植えつけ、30℃にて72時間、振盪下に行なった。培養後、遠心上清中のレート

次にプロモーター領域をさらに限定するため、EcoRI-HindIII断片をAluI或いは、HaeIIIで切断し、各断片をpKK223-8上にサブクローン化した(第5図)。その結果AluI-HindIII断片(51bp.)及びHaeIII-HindIII(135bp.)上にプロモーターが存在することが明らかとなった。同様の結果を*E. coli*のプロモーター探査ベクターpKK232-8(Ap耐性、クロラムフェニコール感受性)を用いて得ており、AluI-HindIII断片(51bp.)上にプロモーターが存在することを確認した。

実施例6.

ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺伝子(*trpD*)、N-(5-ホスホリボシル)アンスラニル酸イソメラーゼ-インドール-3-グリセロールリン酸シンターゼ遺伝子(*trpC*)、トリプトファンシンターゼ遺伝子(*trpB*、*trpA*)の増幅によるトリプトファン生産菌の育種。

クローニングしたブレビバクテリウムラクトフェルメンタムトリプトファンオペロンのうち*trpD*、*trpC*、*trpB*、*trpA*の4遺伝子を有する組換えアラ

リプトファンをロイコノストック・メセンテロイデス(*Leuconostoc mesenteroides*)ATCC 8042を定量菌株として用いるバイオアッセイ法によって求めた。

第2表 形質転換株のレートリプトファン蓄積量

菌株	レートリプトファン蓄積量
M 247	0.16 g/dl
PEM-P-8014	
AJ 12195 (M 247/pAJ 234)	0.52 g/dl

尚、M 247を得るために寄託されたAJ 12195より宿主細胞を損うことなく宿主細胞中の複合プラスミドを除去することが可能である。即ち、プラスミドは宿主より自然に失なわれることもあるし、「除去」操作によって除くことができる(Bact. Rev., 36, p361-405(1972))。他の除去操作の例は以下の通りである。AJ 12195をCMG液体培地に接種し、37℃で一晩培養(高温処理)後、培養液を適当に希釈し、クロラムフェニコールを含有し又は含有しないCMG寒天培地に塗布し、30℃で1~3日間培養する。かくしてクロラム

フェニコール感受性株として分離される株が
247 である。

4. 図面の簡単な説明

第1図
組換えプラスミドの挿入DNA断片の制限酵素
地図

382

プレビバクテリウムラクトフェルメンタムの トリプトファンオペロンの塩基配列決定のため の戦略図

種々の制限酵素で切断したDNA断片をpUC18, pUC19, 或いはM13mp10にクローン化し、矢印で示した方向へ、dideoxy法により塩基配列を決定した。

第3圖

ブレビバクテリウムラクトフェルメンタムの
トリプトファンオペロンの制御領域
-ブレビバクテリウムラクトフェルメンタムの
trpE構造遺伝子の5'上流域の塩基配列並びに
推定されるアミノ酸配列、及び、予想される

RNA の 2 次構造 -

第四圖

プレビバクテリウムラクトフェルメンタムの
トリプトファンオペロンの構造とプロモーター、
オペレーター領域の単離、同定のための戦略

第5回

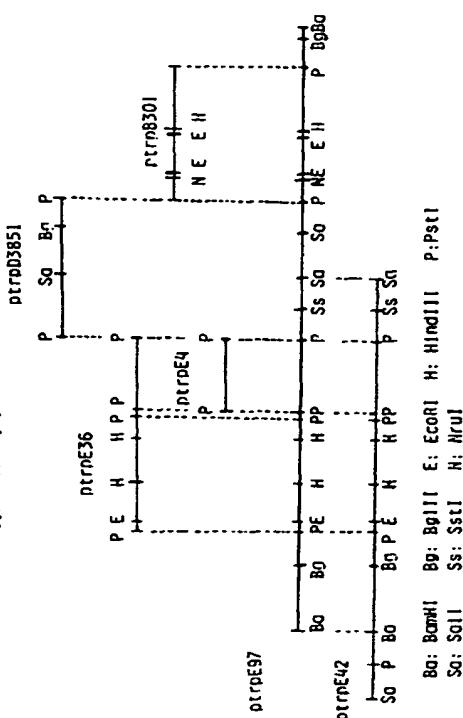
プレビバクテリウムラクトフェルメンタムの
トリプトファンオペロンの構造とプロモーター、
オペレーター領域の限定のための戦略
-35 及び -10 は *E. coli* のプロモーターコンセン
サス配列の -35 、及び -10 領域に相当する領域
を示す

第6回

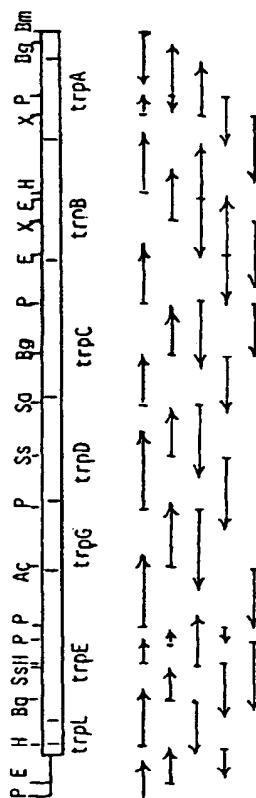
ブレビバクテリウムラクトフェルメンタムの トリプトファンオペロンのターミネーターの構 造

特許山願人 味の素株式会社

圖 1 第

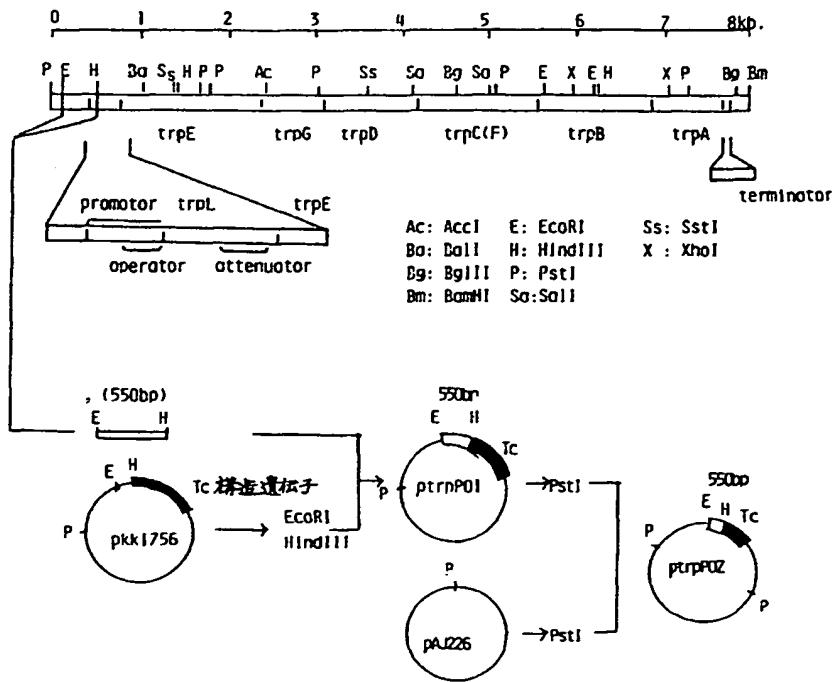


2

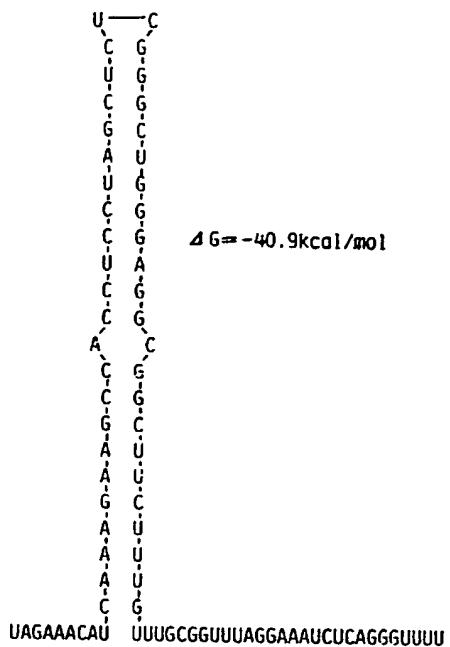


三 節

第 4 図



第 6 図



第 1 頁の続き

⑤Int.Cl. 4

// C 12 P 21/02
(C 12 P 13/22
C 12 R 1:13)
(C 12 P 13/22
C 12 R 1:15)

識別記号

府内整理番号

6712-4B

手 纸 补 正 表

昭和61年6月3日

特許厅長官印

1. 事件の表示

昭和61年特許第87600号

2. 広島の名称

トリプトファンオペロン、トリプトファンオペロンにコードされるペプチド及び蛋白、トリプトファンオペロンの遺伝子発現利用方法及びトリプトファンの製造法

3. 締正をする旨

事件との關係　特許出願人

住所：東京都中央区京橋一丁目 5番 8号

名称 (006) 味の素株式会社

代表者 取締役社長 久山 駿

4. 補正命令の日付 自発

5.補正により増加する発明の数 なし

6. 補正の対象 明細書の充実の詳細な説明の欄

および図面（第1図、第2図、第4図）

圖
1964.6.4

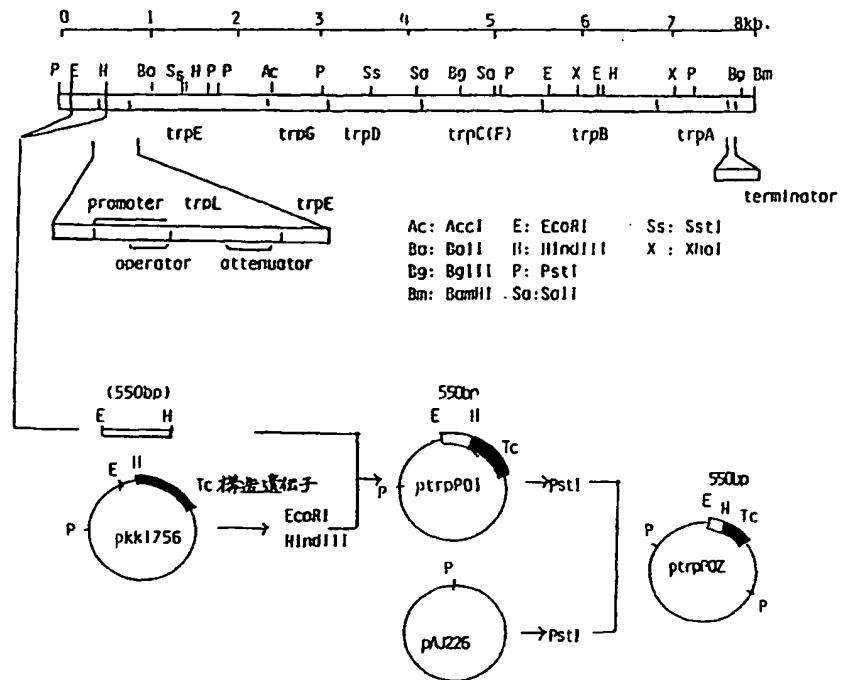
四
一
集

B1 [RD3851]

四庫全書

Diagram of the pET-28a(+) vector showing restriction sites and transcription start sites. The vector is a plasmid with a HindIII site at the top. It contains a T7 promoter (P), a T7 RNA polymerase gene (trpE), a multiple cloning site (BamHI, SstI, PstI, SalI, SstI, XbaI, EcoRI, XbaI), a trpC gene, a trpD gene, a trpB gene, and a trpA gene. Arrows indicate transcription direction from the T7 promoter.

第 4 図



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.